

10 9

Federal Republic of Germany

German Patent Office

OFFENLEGUNGSSCHRIFT

DE 32 16 870 A1

File No.: P 32 16 870.5

Filing Date: 5-3-82

Offenlegungs Date: 11-3-83

Int. Cl.: ³

A 61 K 31/48

A 61 K 31/495

Applicant:

Schering AG, 1000 Berlin and 4709

Bergkamen, DE

Inventor:

Dr. R. Horowski, 1000 Berlin, DE, Dr. G.

Birkmayer, 8000 Munich, DE

PHARMACEUTICAL PREPARATIONS WITH A CYTOSTATIC EFFECT

A pharmaceutical preparation with a cytostatic effect, based on ergot alkaloids, such as lisuride, with an affinity for monoamine receptors.

PHARMACEUTICAL PREPARATIONS WITH A CYTOSTATIC EFFECT

The invention relates to the object of the claims.

It has long been known that ergot alkaloids are pharmacologically active. The therapeutic applications of some representatives have become known recently. For example, bromocriptin (German Auslegeschrift 1 926 045) is used in therapy as a lactation inhibitor. Lisuride hydrogen maleate (US patent 3,681,497) is known for the relief of migraine. Trans-dihydrolisuride (German Auslegeschrift 2,238,540) is pharmacologically active, for example, as a nidation inhibitor.

It has now been found that the ergolines, which are used pursuant to the invention, have cytostatic activity.

In vitro, the ergolines inhibit the proliferation of human leukemia cells, lung carcinoma cells and breast cancer cells.

In this connection, the following investigations were conducted:

Human leukemia cells, lung cancer cells and breast cancer cells were grown *in vitro* in a culture medium (minimum essential medium with 10% fetal calf serum), to which increasing concentrations of lisuride (5, 20, 40 and 100 $\mu\text{g/mL}$) were added in the form of hydrogen maleate and which was replaced every second day by a fresh medium with lisuride, the amount of ergot alkaloid being related to the free base, lisuride. The growth kinetics, that is, the proliferation rate per unit time, were ascertained by determining the cell count after 48, 96 and 144 hours and compared with that of cells, which were cultured in a lisuride-free medium.

It was possible to observe a dosage dependent and time dependent inhibition of the cell proliferation, the maximum values of which for the individual concentrations are listed in the following:

5 µg/mL up to 18% inhibition
20 µg/mL up to 53% inhibition
40 µg/mL up to 68% inhibition
100 µg/mL more than 100% inhibition

At a concentration of 100 µg/mL, lisuride exhibited a cytotoxic as well as a cytostatic effect. Normal cells, such as adult and embryonic lung fibroblasts and normal epithelial breast cells, were inhibited minimally, if at all, when tested under the same experimental conditions, even at concentrations of 100 µg/mL.

Moreover, the findings were confirmed *in vitro* with small rodents.

For this purpose, Han-Wistar rats were treated orally for 104 - 107 weeks with 0.02, 0.2 and 1.0 mg of lisuride/kg. In so doing, it was possible to reduce the mortality, which is predominantly tumor-dependent in rodents, as a function of the dosage. At the same time, the frequency of occurrence of pituitary tumors, breast tumors, follicular thyroid adenomas, corticosuprarenomas, phechromocytomas and pancreas islet cell adenomas was inhibited by the treatment, mostly as a function of the dosage.

Moreover, NMRI mice were treated orally with 0.02, 0.06 and 0.2 mg of lisuride/kg for 104 - 107 weeks. Here also, there was a partial reduction in the mortality and a slight inhibition in the development of pituitary adenomas and cystadenomas of the ovaries and a distinct inhibition in the occurrence of lung adenocarcinomas and mouse leukemias.

The selective effect on tumors is also supported by the fact that ergot alkaloids, such as lisuride, accumulate selectively in individual organs and, with that, achieve particularly high effectiveness here. Aside from investigations of the binding of radioactive lisuride, especially the findings of an accumulation of lisuride in animal and human cells by optical fluorescence methods of detection when these cells are incubated, are also of importance here. For example, when human white blood cells were incubated with 10^{-7} - 10^{-5} molar concentrations of lisuride, there was a massive accumulation of lisuride fluorescence.

Within the meaning of this invention, all ergot alkaloids with a monoamine receptor affinity are suitable as ergolines. The following are named as examples: lisuride hydrogen maleate, 1,1-diethyl-3-(6-methyl-8 β -ergolinyl)-urea, 1,1-diethyl-3-(2-bromo-6-methyl-8 β -ergolinyl)-urea, 1,1-diethyl-3-(2-bromo-6-methyl-9,10-didehydro)-urea, 1,1-diethyl-3-(9,10-didehydro-6-n-propyl-8 β -ergolinyl)-urea, 1,1-diethyl-3-(6-n-propyl-8 β -ergolinyl)-urea, pergolide, lergotril, bromocriptin and ergotamine.

The ergolines, used pursuant to the invention, can be used in free form or in the form of their addition salts. Such addition salts are derived, preferably from physiologically tolerated acids, such as tartaric acid, maleic acid, methanesulfonic acid, phosphoric acid and hydrochloric acid.

It was entirely surprising that ergolines, which are known to react over monoamine receptors, inhibit the growth and proliferation of malignant cells, such as those of human leukemia, lung carcinomas and breast cancers.

The ergolines, used pursuant to the invention, have the advantage over known cytostatic agents, such as endoxan or methotrexate, which have a growth-inhibiting

effect on all dividing cells, that there are no serious side effects, which occur with the latter, such as disorders in formation of blood and in the gastrointestinal tract, loss of hair and spermiogenesis disorders, etc. This is confirmed by the absence of growth-inhibiting effects on cultures of normal, non-tumoral cells and also by the fact that none of these effects are observed when long-term tolerance tests and carcinogenicity tests are carried out with these substances on animals and when broad clinical tests are carried out on man.

Because of this absence of side effects, the active ingredients, usable pursuant to the invention, can thus also be used for treatments, which extend far beyond the usually employed three months and likewise for patients, who do not tolerate the side effects of known cytostatic drugs, such as lowered resistance, anemia, tendency to bleed, etc.

The ergolines, used pursuant to the invention, are suitable for the treatment of leukemia and all solid, human tumors. In particular, however, they are suitable for the treatment of leukemias and related carcinomas, such as neuroblastomas, thyroid carcinomas and adrenocortico carcinomas and of bronchial, lung and breast carcinomas.

The active ingredient is administered in the form of pharmaceutical preparations. For example, the pharmaceutical preparation can be used in the form of tablets, powders, granulates, capsules, syrups and elixirs for oral administration as well as in the form of solutions, suspensions, dispersions and emulsions for parenteral administration, for example, in the form of a sterile, injectable aqueous solution. The preparations, suitable for oral administration, may contain the conventional carriers and inactive ingredients. The active ingredients may also be microencapsulated, for example, for sustained release formulations.

Of course, the amount of active ingredient, to be administered daily, depends on the nature of the case to be treated. In general, satisfactory results are achieved with a dose ranging from about 0.01 to 10 mg/kg per body weight of the test animal. If necessary, the dose can be administered in two to three portions.

When used in human medicine, the amount to be administered orally is 0.01 to 50 mg/day and preferably 0.5 to 10 mg/day. For parenteral administration, for example, by injection, as an interval treatment or by infusion as a continuous treatment, the daily dose is 0.15 to 1.5 mg.

The individual dosage forms contain 0.01 to 5 mg of active ingredient per dosage unit.

From the point of view of production and an advantageous method of administration, injection preparations are preferred in the form of ampuls or solid preparations, particularly in the form of capsules and tablets.

The following examples serve to explain the invention further.

Example 1

The ampuls, suitable for parenteral administration, are produced by known methods. For this purpose, lisuride hydrogen maleate (0.0005 g) is dissolved in water p.i., diluted to 1 mL and sterilized.

Example 2

The tablets, which are suitable for oral administration and contain the components described below, are produced by known means.

ComponentsWeight

1.1 diethyl-3-(6-methyl-8 β -ergolinyl)-urea
dihydrogen phosphate

1.00 mg

lactose

98.05 mg

corn starch

14.00 mg

polyvinyl pyrrolidone

5.00 mg

magnesium stearate

0.70 mg

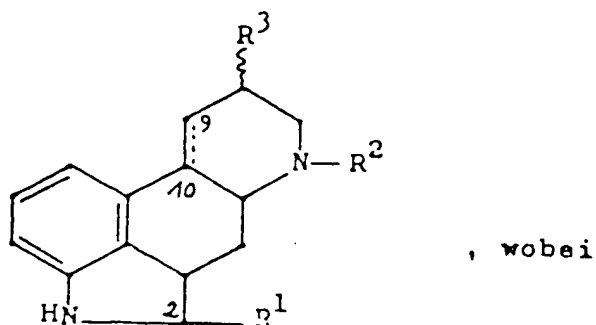
talcum

1.25 mg

120.00 mg

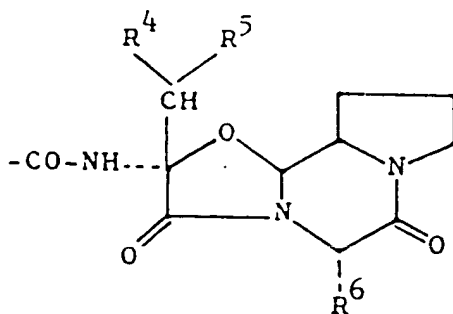
Claims

1. A pharmaceutical preparation with cytostatic effect based on ergot alkaloids with an affinity for monoamine receptors.
2. The pharmaceutical preparation of claim 1, characterized in that the ergot alkaloid is an ergoline derivative of the general formula



wherein

- R^1 is hydrogen, chlorine, bromine or iodine,
 R^2 is hydrogen or a C_1 to C_6 alkyl group,
 R^3 is $-CH_2-CN$, $-CH_2-S-CH_3$, $-NH-SO_2-NR'R''$, $-NH-CS-NR'R''$ or $-NH-CO-N'R''$ (R' , $R'' = H, C_{1-6}$ alkyl)



- (R^4, R^5 is hydrogen or methyl and
 R^6 is phenylmethyl, isobutyl or isopropyl)

and

C₉ --- C₁₀ is a carbon-carbon single or double bond.

3. The pharmaceutical preparation of claims 1 and 2, characterized in that the ergot alkaloid is lisuride.
4. The pharmaceutical preparation of claims 1 and 2, characterized in that the ergot alkaloid is 1,1-diethyl-3-(6-methyl-8 β -ergolinyl)-urea.
5. The pharmaceutical preparation of claims 1 and 2, characterized in that the ergot alkaloid is 1,1-diethyl-3-(6-n-propyl-8 β -ergolinyl)-urea.
6. The pharmaceutical preparation of claims 1 and 2, characterized in that the ergot alkaloid is 1,1-diethyl-3-(2-bromo-6-methyl-9,10-didehydro-8 β -ergolinyl)-urea.
7. The pharmaceutical preparation for the treatment of leukemia and all solid human tumors of claims 1 and 2, characterized in that the ergot alkaloid is contained in an amount of 0.01 to 5 mg.

⑩ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 32 16 870 A 1

⑬ Int. Cl. 4
A 61 K 31/48
A 61 K 31/485

⑲ Aktenzeichen: P 32 16 870 5
⑳ Anmeldetag: 3. 5. 82
㉑ Offenlegungstag: 3. 11. 83

⑭ Anmelder
Schering AG, 1000 Berlin und 4709 Bergkamen, DE

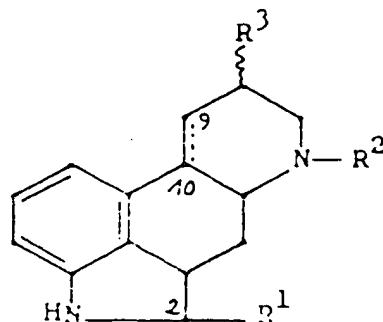
⑰ Erfinder
Horowski, Reinhard, Dr., 1000 Berlin, DE, Bismarckstr. 1
Georg, Dr., 8000 München, DE

⑮ Pharmazeutische Zubereitungen mit zytostatischer Wirkung

Pharmazeutische Zubereitung mit zytostatischer Wirkung
auf Basis von Ergot-Alkaloiden wie Lisurid mit einer Affinität zu
Mocodamin-Rezeptoren.
(32 16 870)

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zubereitung mit zytostatischer Wirkung auf Basis von Ergot-Alkaloiden mit einer Affinität zu Monoamin-Rezeptoren.
2. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Ergot-Alkaloid ein Ergolin-Derivat der allgemeinen Formel



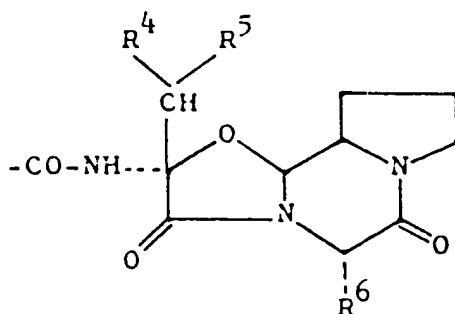
, wobei

R¹ Wasserstoff, Chlor, Brom und Jod,

R² Wasserstoff und C₁₋₆-Alkyl,

R³ -CH₂-CN, -CH₂-S-CH₃, -NH-SO₂-NR'R'', -NH-CS-NR'R''
und -NH-CO-NR'R'' (R', R'' = H, C₁₋₆-Alkyl),

- 2 -



(R⁴, R⁵ = Wasserstoff und Methyl und
R⁶ Phenylmethyl, Isobutyl und Isopropyl)

und

C₉==C₁₀ eine CC-Einfach- oder -Doppelbindung
darstellen, ist.

3. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Ergot-Alkaloid Lisurid ist.
4. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Ergot-Alkaloid 1.1-Diethyl-3-(6-methyl-8β-ergolinyl)-harnstoff ist.
5. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß Ergot-Alkaloid 1.1-Diethyl-3-(6-n-propyl-8β-ergolinyl)-harnstoff ist.
6. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß Ergot-Alkaloid 1.1-Diethyl-

. 3 .

.3-(2-brom-6-methyl-9.10-didehydro-8 β -ergoliny1)-
harnstoff ist.

7. Pharmaceutische Zubereitung zur Behandlung von Leukämie
und allen soliden menschlichen Tumoren nach Anspruch
1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Ergot-Alkaloid
in einer Menge von 0,01 - 5 mg enthalten ist.

D 000000

3216870

.4.

PHARMAZEUTISCHE ZUBEREITUNGEN
MIT ZYTOSTATISCHER WIRKUNG

Die Erfindung betrifft den Gegenstand der Patentansprüche.

Es ist seit langem bekannt, daß Ergot-Alkaloide pharmakologisch wirksam sind. In neuerer Zeit sind therapeutische Anwendungen einiger Vertreter bekannt geworden. Zum Beispiel wird das Bromocriptin (DE AS 1 926 045) als Laktationshemmer in Therapie angewendet. Lisuridhydrogenmaleat (US PS 3,681,497) ist als Migränemittel bekannt. Trans-dihydro-Lisurid (DE AS 2.238.540) wirkt pharmakologisch, z.B. als Nidationshemmer.

Es wurde nun gefunden, daß die erfindungsgemäß verwendeten Ergoline zytostatisch wirken.

Die Ergoline hemmen in vitro die Vermehrung (Proliferation) von menschlichen Leukämiezellen, Lungenkarzinom- und Mammakarzinomzellen.

Hierzu wurden folgende Untersuchungen angestellt:

Menschliche Leukämiezellen, Lungenkarzinom- und Mammakarzinomzellen wurden in vitro mit einem Kulturmedium (Minimal essentielles Medium mit 10 % fötalem Kalberserum) gezüchtet, dem steigende Konzentrationen von Lisurid (5, 20, 40 und 100 µg/ml) in Form des Hydrogenmaleats zugesetzt wurden und das jeden 2. Tag durch frisches Medium mit Lisurid ersetzt wurde, wobei sich die Menge des Ergot-Alkaloids auf die freie Base Lisurid bezieht. Die Wachstumskinetik, d.h. die Vermehrungsrate pro Zeiteinheit, wurde durch Bestimmung der Zellzahl nach 48, 96 und 144 Stunden ermittelt und mit der von Zellen verglichen, die in Lisurid-freiem Medium kultiviert wurden.

Es konnte eine Dosis- und Zeit-abhängige Hemmung der Zellvermehrung beobachtet werden, deren Maximalwerte bei den einzelnen Konzentrationen im folgenden aufgeführt sind:

- 5 5 µg/ml bis 18 % Hemmung
 20 µg/ml bis 53 % Hemmung
 40 µg/ml bis 68 % Hemmung
 100 µg/ml mehr als 100 % Hemmung.

10 Bei einer Konzentration von 100 µg/ml zeigte Lisurid neben einer zytostatischen somit auch eine zytotoxische Wirkung. Unter gleichen Versuchsbedingungen geprüfte Normalzellen, wie adulte und embryonale Lungenfibroblasten sowie normale Mamma-Epithelzellen wurden selbst von hohen Lisurid-Dosen, wie 100 µg/ml, wenn überhaupt nur minimal
15 gehemmt.

Des weiteren wurde in vivo der gleiche Befund an Kleinnagern bestätigt.

Hierzu wurden Han-Wistar-Ratten während 104 - 107 Wochen mit 0,02, 0,2 und 1,0 mg Lisurid/kg oral behandelt. Da-
20 bei ließ sich die - beim Nager überwiegend tumorbedingte - Sterblichkeit dosisabhängig reduzieren. Ebenso wurde die Häufigkeit des Auftretens von Hypophysen- und Mammatumoren, follikulären Schilddrüsenadenomen, Nebennierenrindentumoren, Phäochromozytomen und Pankreasinseldrüsenadenomen durch die Behandlung meist in Abhängigkeit von
25 der Dosis gehemmt.

Des weiteren wurden NMRI-Mäuse mit 0,02, 0,06 und 0,2 mg Lisurid/kg oral während 104 - 107 Wochen behandelt. Auch

hier kam es teilweise zur Verminderung der Mortalität sowie zu einer geringfügigen Hemmung der Entstehung von Hypophysenadenomen und Zystadenomen des Ovars sowie zu einer deutlichen Hemmung des Auftretens von Lung adenokarzinomen und Mäuseleukämien.

Die selektive Wirkung auf Tumore wird auch dadurch unterstützt, daß sich Ergot-Alkaloide wie z.B. Lisurid in einzelnen Organen selektiv anreichern und damit hier zu besonders hoher Wirksamkeit gelangen.

10 Neben Untersuchungen zur Bindung von radioaktivem Lisurid sind hier auch besonders Befunde von Bedeutung, bei welchen sich bei Anwendung von fluoreszenz-optischen Nachweismethoden bei Inkubation tierischer und menschlicher Zellen eine Anreicherung von Lisurid in diesen

15 Zellen zeigte und sich z.B. bei weißen Blutzellen des Menschen eine massive Anreicherung der Lisuridfluoreszenz bei Inkubation dieser Zellen mit 10^{-7} - 10^{-5} -molarer Konzentration von Lisurid fand.

Als Ergoline im Sinne dieser Erfindung sind an sich alle

20 Ergotalkaloide mit einer Morcamin-Receptor-Affinität geeignet. Beispielsweise genannt seien Lisuridhydrogenmaleat, 1.1-Diethyl-3-(6-methyl-8 β -ergolinyl)-harnstoff, 1.1-Diethyl-3-(2-brom-6-methyl-8 β -ergolinyl)-harnstoff, 1.1-Diethyl-3-(2-brom-6-methyl-9.10-didehydro)-harnstoff,

25 1.1-Diethyl-3-(9.10-didehydro-6-n-propyl-8 β -ergolinyl)-harnstoff, 1.1-Diethyl-3-(6-n-propyl-8 β -ergolinyl)-harnstoff, Pergolid, Lergotril, Bromocriptin und Ergotamin.

Die erfindungsgemäß verwendeten Ergoline können in freier Form oder in Form ihrer Additionssalze verwendet werden.

Solche Additionssalze leiten sich vorzugsweise von physiologisch verträglichen Säuren, wie z.B. der Wein-, Malein-, Methansulfon-, Phosphor- und Salzsäure ab.

5 Es war durchaus überraschend, daß Ergoline, die bekanntermaßer über Monoamin-Receptoren wirken, das Wachstum und die Vermehrung maligner Zellen, wie die von menschlicher Leukämie, Lungenkarzinomen und Mammakarzinomen, hemmen.

10 Die erfindungsgemäß verwendeten Ergoline haben den Vorteil gegenüber bekannten Zytostatica, wie Endoxan oder Methotrexat, die auf alle sich teilenden Zellen wachstumshemmend wirken, daß die bei diesen auftretenden erheblichen Nebenwirkungen, wie Störungen der Blutbildung, im Magen-Darm-Trakt, Haarausfall, der Spermio-genese etc.
15 entfallen.

Dieses wird durch die fehlende wachstumshemmende Wirkung auf normale, nicht-tumorale Zellen in Kultur bestätigt und ebenso dadurch, daß sich bei der Durchführung von Langzeitverträglichkeits- und Karzinogenitätsprüfungen
20 am Tier und auch bei der breiten klinischen Untersuchung am Menschen für die oben angegebenen Substanzen keine dieser Wirkungen zeigen ließen.

Die erfindungsgemäß verwendbaren Wirkstoffe können somit aufgrund dieser fehlenden Nebenwirkungen auch für
25 Therapien eingesetzt werden, die weit über die üblicherweise angewendeten 3 Monate hinausreichen und ebenso bei Patienten, bei welchen die bekannten Zytostatika-Nebenwirkungen wie Abwehrschwäche, Anämie, Blutungsneigung etc. nicht toleriert werden können.

Die erfindungsgemäß verwendeten Ergoline sind zur Behandlung von Leukämie und allen soliden menschlichen Tumoren geeignet. Insbesondere sind sie jedoch zur Behandlung von Leukämien und miteinander verwandten

5 Karzinomen wie Neuroblastomen, Schilddrüsen- und Nebennierenkarzinomen und von Bronchial-, Lungen- und Mastdarmkarzinomen geeignet.

Der Wirkstoff wird in Form von pharmazeutischen Zubereitungen verabreicht. Beispielsweise kann die pharmazeutische Zubereitung in Form von Tabletten, Pulvern,

10 Granulaten, Kapseln, Sirupen und Elixieren für orale Verabreichung sowie in Form von Lösungen, Suspensionen, Dispersionen und Emulsionen für parenterale Verabreichung, beispielsweise einer sterilen injizierbaren

15 wässrigen Lösung verwendet werden. Die für orale Verabreichung geeigneten Zubereitungen können die üblichen Träger- und Hilfsstoffe enthalten, wobei die Wirkstoffe auch, z.B. für Depotformulierungen, mikroverkapselt sein können.

20 Die täglich zu verabreichende Menge an Wirkstoff hängt naturgemäß von der Art des zu behandelnden Falles ab. Im allgemeinen werden befriedigende Resultate erreicht mit einem Dosisbereich von etwa 0,01 bis 10 mg pro kg Körpergewicht des Testtieres, die nötigenfalls in 2-3

25 Anteilen verabreicht werden.

Bei der Anwendung in der Humanmedizin beträgt die zu verabreichende Menge bei oraler Anwendung 0,01 - 50 mg/d, vorzugsweise 0,5 - 10 mg/d. Bei parenteraler Anwendung, z.B. durch Injektion als Intervall- oder

30 durch Infusion als Dauertherapie, beträgt die tägliche Dosis 0,15 - 1,5 mg/d.

-10-

Die einzelnen Dosisformen enthalten pro Dosiseinheit 0,01 bis 5 mg Wirkstoff.

Vom Standpunkt der Herstellung und der günstigen Verabreichungsmöglichkeit werden Injektionspräparate in Form von Ampullen oder feste Zubereitungen, insbesondere Kapseln und Tabletten, bevorzugt.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur weiteren Erläuterung der Erfindung.

Beispiel 1

Die für parenterale Verabreichung geeigneten Ampullen werden in an sich bekannter Weise hergestellt. Hierzu wird Lisuridhydrogenmaleat (0,0005 g) in Wasser p.i. gelöst, auf 1 ml aufgefüllt und sterilisiert.

Beispiel 2

Die für orale Verabreichung geeigneten Tabletten, welche die nachfolgend beschriebenen Bestandteile enthalten, werden in an sich bekannter Weise hergestellt.

<u>Bestandteile</u>	<u>Gewicht</u>
1.1-Diethyl-3-(6-methyl-8 β -ergolinyl)-harnstoff-dihydrogenphosphat	1,00 mg
15 Laktose	98,05 mg
Maisstärke	14,00 mg
Polyvinylpyrrolidon	5,00 mg
Magnesiumstearat	0,70 mg
Talk	1,25 mg
20	<hr/> 120,00 mg